مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۸/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۵

مکمل پروبیوتیک اختلال تقویت دراز مدت (LTP) را در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت مهار می‌کند

سعیده داوری[۱]، سید علیرضا طلایی[۲]، دکتر محمود سلامی[۳]، دکتر محمدرضا فاضلی[۴]، دکتر حجت‌اله علایی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: افزایش بار استرس اکسیداتیو در بیماری دیابت باعث ایجاد اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود. مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها باعث کاهش بار استرس اکسیداتیو می‌شوند. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر القای تقویت دراز مدت (Long-term potentiation یا LTP) در نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۰ رأس موش صحرایی نر که به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی سالم- شاهد، سالم- پروبیوتیک، دیابت- شاهد و دیابت- پروبیوتیک تقسیم شدند. مکمل پروبیوتیک شامل باکتری‌های Lactobacillus acidophilus، Lactobacillus fermentum و Bifidobacterium lactis (۳۳۴ میلی‌گرم از هر سوش) با 10^{10} واحد تشکیل کلنی (cfu~) برای هر باکتری همراه با آب آشامیدنی، هر ۱۲ ساعت به مدت ۸ هفته تجویز شد. با تحریک کولترال‌های شافر هیپوکامپ، پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی میدانی نورون‌ها در ناحیه‌ی CA1 به مدت ۳۰ دقیقه ثبت شدند. سپس تحریک تتانیک اعمال شد و آزمایش به مدت ۱۲۰ دقیقه‌ی دیگر ادامه یافت.

یافته‌ها: القای دیابت باعث کاهش پاسخ پایه در مقایسه با موش‌های شاهد شد ($P < ۰/۰۰۱$) و دریافت پروبیوتیک توانست پاسخ پایه در موش‌های مبتلا به دیابت را به حالت عادی بازگرداند. همچنین، دیابت مانع از القای LTP در نورون‌های ناحیه‌ی CA1 و دریافت مکمل پروبیوتیک باعث بهبود القای LTP شد. در حیوانات گروه دیابت- پروبیوتیک افزایش چشمگیر وزن ($P = ۰/۰۳۱$) و انسولین سرم ($P < ۰/۰۰۱$) و نیز کاهش قند خون ($P = ۰/۰۰۶$) دیده شد.

نتیجه‌گیری: دریافت مکمل پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش ترشح انسولین، کاهش قند خون و افزایش احتمالی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، باعث بهبود اختلال ایجاد شده در القای تقویت درازمدت در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت می‌شود.

واژگان کلیدی: دیابت قندی نوع ۱، تقویت دراز مدت، هیپوکامپ، مکمل پروبیوتیک، موش صحرایی

ارجاع: داوری سعیده، طلایی سید علیرضا، سلامی محمود، فاضلی محمدرضا، علایی حجت‌اله. **مکمل پروبیوتیک اختلال تقویت دراز مدت (LTP) را در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت مهار می‌کند.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۸): ۲۲۴۷-۲۲۳۶

مقدمه

دیابت شیرین یک اختلال مزمن متابولیک است که در نوع ۱ آن (دیابت وابسته به انسولین) به علت تخریب سلول های بتای پانکراس تولید انسولین متوقف

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۰۴۹۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری تخصصی علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، اصفهان
۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حجت‌الله علایی
Email: alaei@med.mui.ac.ir

می‌گردد و در نوع ۲ آن (دیابت غیر وابسته به انسولین) مقاومت به انسولین وجود دارد (۲-۱). بروز عوارض بیماری دیابت به طور عمده به دلیل هیپرگلیسمی (۳)، هیپوانسولینمی یا مقاومت به انسولین (۴) است که منجر به تولید رادیکال های آزاد در سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود (۵). مکانیسم‌های متعدد ایجاد رادیکال های آزاد در بیماری دیابت شامل مسیرهای پلی‌ال (۶)، اتو اکسیداسیون گلوکز (۵)، گلیکوزیلاسیون آنزیم‌های اکسیداتیو (۷) و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در سطح میتوکندری (۸) می باشند. فعال شدن این مکانیسم ها عدم تعادلی بین عوامل اکسیدان و آنتی اکسیدان به سمت افزایش عوامل اکسیدان ایجاد می کند که در اصطلاح «استرس اکسیداتیو» نامیده می‌شود (۹).

در مطالعات مختلف استرس اکسیداتیو به عنوان یک مکانیسم اساسی در پیشرفت دیابت (۱۰) و عامل مؤثر در بروز عوارض گسترده از جمله نوروپاتی محیطی و مرکزی (۱۱) و اختلال در اعمال شناختی و حافظه معرفی شده است (۱۳-۱۲). اختلال در روند یادگیری، حافظه و پردازش اطلاعات پیچیده در هر دو نوع دیابت گزارش شده است (۱۵-۱۴). تقویت دراز مدت (Long-term potentiation یا LTP) و تضعیف دراز مدت (Long-term depression یا LTD) از مکانیسم‌های سلولی درگیر در روند یادگیری و حافظه هستند که به تغییرات قدرت سیناپسی وابسته می‌باشند (۱۶).

بهبود موش های صحرایی مبتلا به دیابت با آنتی‌اکسیدان‌ها این نکته را تأیید می‌کند که استرس اکسیداتیو یک عامل مهم در توسعه‌ی نوروپاتی دیابتی است (۱۸-۱۷). پروبیوتیک‌ها از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی هستند (۲۰-۱۹). پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب مصرف شوند نتایج مفیدی برای سلامت میزبان در پی خواهند داشت (۲۱). این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های تولیدکننده‌ی اسیدلاکتیک با منشأ انسانی شامل بیفیدوباکتری ها، لاکتوباسیل ها و انتروکوکسی‌ها هستند (۲۰). به منظور بهبود اثر پروبیوتیک‌ها ترکیبی از گونه‌های مختلف باکتریایی می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲۴-۲۲). شایع ترین انتخاب مخلوطی از لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریاها است (۲۳). پروبیوتیک ها از طریق کاهش آسیب‌های التهابی و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، استرس اکسیداتیو را مهار می کنند (۱۹). همچنین، نشان داده شده است که پروبیوتیک ها از کاهش انسولین ناشی از دیابت جلوگیری می کنند (۲۵). طبق بررسی های انجام شده تاکنون مطالعه‌ای درباره‌ی اثر پروبیوتیک‌ها بر القای LTP در موش‌های مبتلا به دیابت صورت نگرفته است.

با توجه به مطالب ذکر شده، فرضیه‌ی مطالعه‌ی حاضر این بود که آیا پروبیوتیک‌ها به عنوان سرکوبگرهای استرس اکسیداتیو، می توانند بر القای LTP در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت اثر داشته باشند؟

روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی بر روی ۴۰ رأس موش صحرایی نر نژاد Wistar ۴۵ روزه انجام شد که به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: سالم- شاهد تغذیه شده با غذای استاندارد، شاهد- پروبیوتیک

تغذیه شده با پروبیوتیک همراه با آب آشامیدنی (هر ۱۲ ساعت، ۱ گرم برای هر موش)، دیابت- شاهد تغذیه شده با غذای استاندارد و دیابت- پروبیوتیک تغذیه شده با پروبیوتیک همراه با آب آشامیدنی (هر ۱۲ ساعت، ۱ گرم برای هر موش).

در هر قفس یک رأس حیوان نگهداری می شد. حیوانات از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی آزاد بودند. درجه ی حرارت محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و سیکل روشنایی ۱۲ ساعته (شروع از ۷ صبح) بود. موش‌های مورد مطالعه در گروه‌های شاهد- پروبیوتیک و دیابت- پروبیوتیک مخلوطی از سه باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356)، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (ATCC 9338) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (DSM 10140) را به نسبت مساوی (۳۳۴ میلی‌گرم از هر سوش) با 10^{10} واحد تشکیل کلنی (cfu~) برای هر باکتری همراه با آب آشامیدنی، هر ۱۲ ساعت (۲ بار در روز) و به مدت ۵۶ روز (۸ هفته) دریافت کردند. دریافت پروبیوتیک از روز بعد از القای دیابت آغاز شد.

سوش‌های پروبیوتیک مورد استفاده با فرمولاسیون محلول در آب از شرکت زیست تخمیر تهران خریداری شد. لازم به ذکر است که پروتکل آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق به تأیید کمیته ی نگهداری و استفاده از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان رسید.

القای دیابت توسط استرپتوزوسین به عنوان یک مدل مقرون به صرفه و پر کاربرد در تحقیقات، پیشنهاد می شود و در اغلب گونه های جوندگان قابل استفاده است. برای القای دیابت به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ۶۵ میلی‌گرم استرپتوزوسین (USA ،Sigma-Aldrich) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH= ۴/۵، به صورت داخل صفاقی (تک دوز) تزریق شد. ۵ روز بعد از تزریق، در صورتی که سطح قند خون بیش از ۲۰۰ میلی گرم در هر دسی‌لیتر بود، حیوانات مبتلا به دیابت طلقی شدند (۲۶). وزن بدن و سطح گلوکز حیوانات هر هفته اندازه‌گیری شد.

۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش، موش‌ها به آزمایشگاه منتقل و توسط تزریق داخل صفاقی داروی اورتان (۱/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. مزیت این دارو ایجاد یک بیهوشی کامل و پایدار می‌باشد و در حین آزمایش احتیاجی به تزریق مجدد دارو نیست. با استفاده از رفلکس قرنیه و اعمال تحریک دردناک به پنجه‌ی پای حیوان از بیهوشی کامل اطمینان حاصل شد. پس از ثابت نمودن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (USA ،Stoelting)، با تزریق ۰/۵ میلی لیتر محلول لیدوکایین ۱ درصد زیر پوست سر حیوان بی‌حسی موضعی نیز ایجاد می‌شد. سپس، با استفاده از قیچی نوک‌تیز پوست سر از ناحیه ی پشت گردن تا نزدیک بینی برداشته شد و تمامی بافت‌ها به طور کامل کنار زده شدند تا جمجمه نمایان شود.

پس از تعیین نواحی برگما، لامبدا و خط وسط روی جمجمه محل قرارگیری الکترودها به وسیله‌ی اطلس استریوتاکس مشخص شد. الکترود تحریکی ۴/۲ میلی متر پشت برگما و ۳/۸ میلی متر در جهت جانبی خط وسط قرار گرفت. در نقطه‌ای که ۳/۴ میلی‌متر پشت برگما و ۲/۵ میلی‌متر دورتر از خط وسط بود، الکترود ثبات مستقر شد. سپس توسط یک مته ی دندانپزشکی مختصات علامت‌گذاری شده

سوراخ شد؛ به طوری که در پایان جهت امکان عبور الکترودها سخت شامه توسط یک سوزن بسیار ظریف پاره گردید.

الکترودها از جنس استیل زنگ‌نزن با پوشش تفلون و قطر ۰/۰۰۵ اینچ (A-M Systems USA) بودند. الکترود دو قطبی تحریکی ۲/۴ میلی‌متر از سطح سخت شامه پایین برده شد تا به کولترال‌های شافر نورون‌های ناحیه‌ی CA3 هیپوکامپ برسد. الکترود تک قطبی ثبات نیز با فواصل ۱۰ میکرون و با دقت حدود ۲/۵ میلی متر زیر شخت شامه برده شد تا به دندریت نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ برسد. محل صحیح الکترودها با روش الکتروفیزیولوژیکی ردیابی شد. پس از قرار گرفتن الکترودها در محل اختصاصی و برای اطمینان بیشتر با اعمال پالس‌های تحریکی زوج (Paired pulse) صحت محل الکترود مورد بررسی قرار گرفت. بلندتر بودن دامنه‌ی دومین پاسخ نسبت به دامنه‌ی پاسخ اول نشان از درستی محل قرارگیری الکترودهای پایداری و تحریکی داشت.

در پاسخ به تحریک کولترال‌های شافر، پتانسیل‌های پس‌سیناپسی تحریکی (EPSP یا Excitatory post synaptic potential) ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ ابتدا توسط آمپلی‌فایر (I.R.Iran ،WSI, A3308) تقویت شدند و سپس با ورود به Data acquisition board (Australia ،AD Instruments) تبدیل به داده‌های رقومی شدند و در پایان ثبت گردیدند. پس از حدود ۳۰ دقیقه ثبت اولیه‌ی پاسخ‌ها و زمانی که دامنه‌ی پاسخ با شدت تحریک ثابت بدون تغییر ماند، منحنی Input/output رسم شد. شدتی از تحریک الکتریکی که در آن ۶۵ درصد حداکثر دامنه‌ی پاسخ به دست می‌آمد، به عنوان شدت تحریک برای ادامه‌ی روند آزمایش و نیز برای اعمال تحریک تتانیک انتخاب شد. تحریکات با فرکانس ۰/۱ هرتز، مدت ۱۰۰ میلیونیم ثانیه و با تأخیر ۲ هزارم ثانیه اعمال گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه EPSP ها ثبت شدند. برای القای LTP در مدار نورونی مورد آزمایش تحریک تتانیک با فرکانس بالا (HFS یا High frequency stimulation) اعمال شد. الگوی این تحریک شامل ۱۰ قطار با فرکانس ۱۰۰ هرتز و فاصله‌ی ۲ هزارم ثانیه بود (۲۷). مدت زمان هر پالس تحریکی نیز ۱۰۰ میلیونیوم ثانیه بود. پس از تحریک تتانیک روند تحریک و ثبت به مدت ۲ ساعت ادامه یافت. از نرم‌افزار Scope for windows ساخت شرکت PowerLab برای القای تحریک و ثبت و نیز تجزیه و تحلیل پاسخ‌ها استفاده شد.

بعد از انجام آزمایشات الکتروفیزیولوژی، خون‌گیری از ورید دمی موش ها انجام شد. میزان قند خون موش‌ها توسط گلوکومتر سنجیده شد. بعد از سانتریفیوژ و جدا کردن سرم خون، سطح انسولین سرم خون با استفاده از کیت تجاری (USA ،Caymanchem) ارزیابی شد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج، درصد تغییر دامنه‌ی پاسخ‌ها بر حسب میلی‌ولت قبل و بعد از دریافت دارو و بعد از اعمال تحریک تتانیک مورد ارزیابی قرار گرفت. معیار وقوع LTP حداقل ۲۰ درصد افزایش در دامنه ی پاسخ ها پس از تحریک تتانیک بود. داده‌ها با استفاده از آزمون Two way ANOVA به همراه آزمون Bonferroni آنالیز گردید و $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

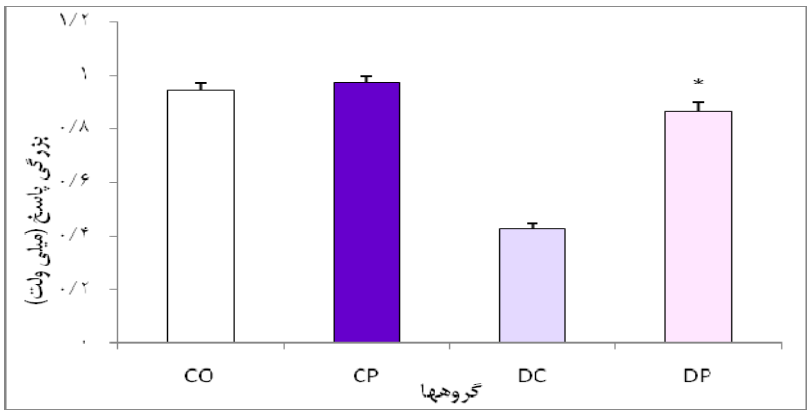
در این مطالعه تأثیر پروبیوتیک بر پاسخ‌های پایه‌ی نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ و نیز القای LTP در این پاسخ‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۱) اثر پروبیوتیک بر پاسخ‌های پایه‌ی ناحیه CA1 هیپوکامپ

نتایج حاصل از بررسی EPSPهای تحریک شده به صورت میدانی (fEPSP)ثبت شده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در پاسخ به تحریک کولترال‌های شافر با آزمون Two way ANOVA نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش شده وجود داشت ($F_{7, 1592}$ = ۴۰۷/۷۳۳ با P < ۰/۰۰۱). با القای دیابت دامنه‌ی پاسخ‌های پایه از ۰/۰۳ ± ۰/۹۴ میلی‌ولت به ۰/۰۲ ± ۰/۴۲ میلی‌ولت رسید. با توجه به نتایج آزمون تعقیبی Bonferroni می‌توان دریافت که القای دیابت باعث کاهش معنی‌داری در دامنه‌ی پاسخ‌ها در موش‌های مبتلا به دیابت نسبت به موش‌های سالم شده است (P < ۰/۰۰۱). تجویز پروبیوتیک در موش‌های مبتلا به دیابت منجر به یک افزایش ۱۰۴ درصدی دامنه‌ی پاسخ‌ها نسبت به موش‌های گروه دیابت- شاهد شد (P < ۰/۰۰۱)، اما این بهبودی پاسخ تا حدی نبود که میانگین دامنه‌ی پاسخ‌ها درگروه دیابت- پروبیوتیک به گروه سالم- شاهد برسد (P = ۱) (شکل ۱).

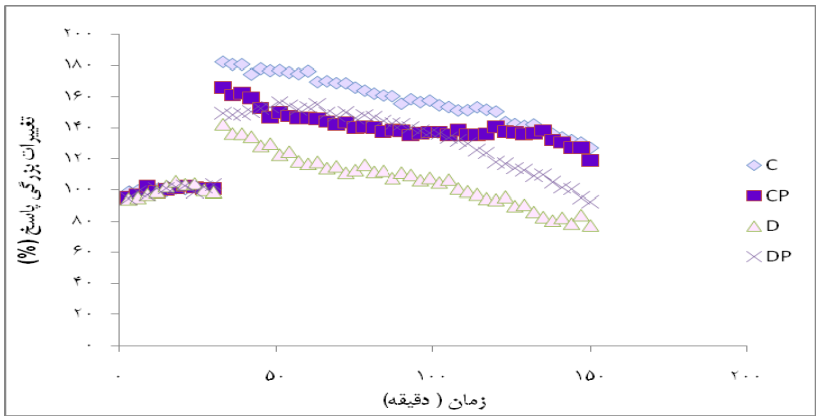
۲) اثر پروبیوتیک بر القای LTP در fEPSPهای ثبت‌شده از ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ

تحریک تتانیک کولترال‌های شافر در هیپوکامپ موش‌های صحرایی در همه‌ی گروه‌های آزمایش منجر به افزایش در دامنه‌ی fEPSPها گردید. با استفاده از آزمون Two way ANOVA مشخص شد که اختلاف قبل از القای تحریک تتانیک و بعد از آن معنی‌دار بود. بررسی داده‌ها با پس آزمون Bonferroni حاکی از آن بود که القای دیابت باعث جلوگیری از القای LTP در موش‌ها می‌شود (P < ۰/۰۰۱)، در حالی که استفاده از پروبیوتیک از سرکوب LTP در موش‌های مبتلا به دیابت ممانعت می‌کند؛ به طوری که اختلاف معنی‌داری در القای LTP بین موش‌های دیابتیک گروه شاهد و موش‌های مصرف‌کننده‌ی پروبیوتیک مشاهده شد (P < ۰/۰۰۱).



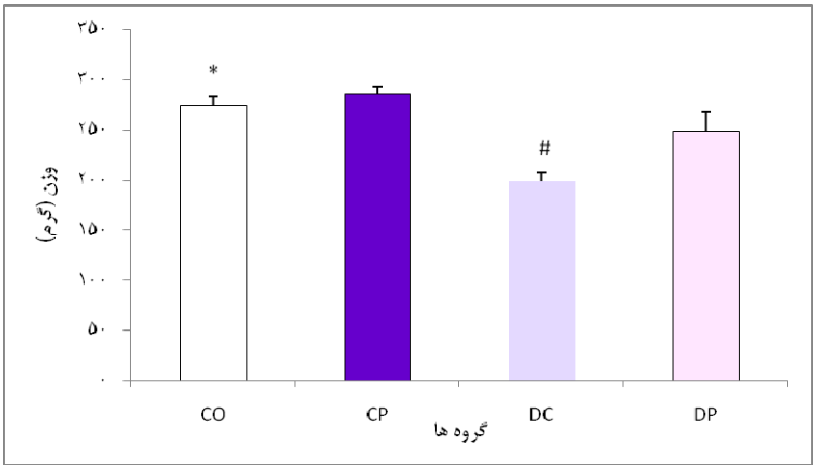
شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین دامنه‌ی پاسخ‌های پایه‌ی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ در گروه‌های آزمون‌شده

***: اختلاف بین دو گروه CO (سالم- شاهد) و DC (دیابت- شاهد) و نیز DC و DP (دیابت- پروبیوتیک) معنی‌دار و بین گروه‌های DP و CO معنی‌دار نبود.**



شکل ۲. القای LTP در fEPSPهای ثبت‌شده از هیپوکامپ موش‌های گروه‌های مورد مطالعه

*: **اختلاف بین دو گروه CO (سالم- شاهد) و DC (دیابت- شاهد)، DC و DP (دیابت- پروبیوتیک) و همچنین DP و CO معنی‌دار بود.**



شکل ۳. وزن موش‌ها (بر حسب گرم) در روز آخر آزمایش در گروه‌های مختلف.

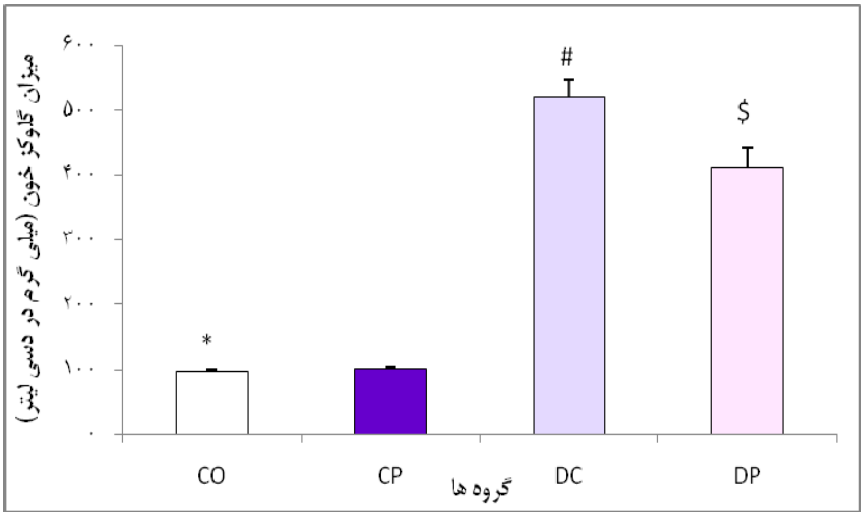
داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نمایش داده شده است.

*: **اختلاف بین DC (دیابت- شاهد) و CO (سالم- شاهد)(P < ۰/۰۰۱)** #: **اختلاف بین DC و DP (دیابت- پروبیوتیک) (P = ۰/۰۳۱)**

اما این ممانعت سرکوب و بهبود القا به حدی نبود که القای LTP در موش‌های مبتلا به دیابت مصرف‌کننده ی پروبیوتیک به حد القای LTP در موش‌های گروه سالم- شاهد برسد و بنابراین تفاوت بین گروه های دیابت- پروبیوتیک و سالم- شاهد همچنان معنی‌دار باقی ماند (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۲).

۳) اثر پروبیوتیک بر وزن، قند خون و انسولین

ارزیابی وزن حیوانات در روز آخر آزمایش نشان داد که القای دیابت به طور معنی داری باعث کاهش وزن موش‌ها شد و وزن موش‌ها در دو گروه سالم- شاهد و دیابت- شاهد کاهش معنی‌دار داشت (P < ۰/۰۰۱). در حالی که تجویز مکمل پروبیوتیک باعث جلوگیری از کاهش وزن موش‌های مبتلا به دیابت شد (P = ۰/۰۳۱ در مقایسه‌ی دیابت- شاهد و دیابت- پروبیوتیک) تاحدی که اختلاف معنی‌داری بین گروه دیابت- پروبیوتیک و سالم- شاهد مشاهده نشد (P = ۰/۷۹۴) (شکل ۳).



شکل ۴. قند خون موش‌ها (بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در روز آخر آزمایش در گروه‌های مختلف

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نمایش داده شده است.

***: اختلاف بین DC (دیابت- شاهد) و CO (سالم شاهد) (P < ۰/۰۰۱) #: اختلاف بین DC و DP (دیابت- پروبیوتیک) (P = ۰/۰۰۶).**

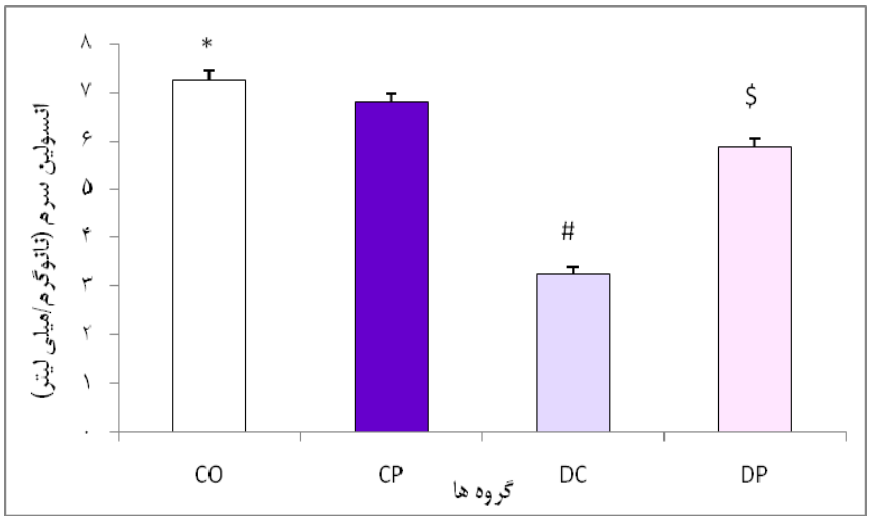
$: اختلاف بین DP و CO (P < ۰/۰۰۱)

سنجش قند خون موش‌ها در روز آخر آزمایش توسط گلوکومتر انجام شد. طبق انتظار القای دیابت باعث افزایش بیش از ۵ برابر قند خون در موش های مبتلا به دیابت نسبت به موش‌های سالم (۲۸/۱۵ ± ۵۲۰/۶ در برابر ۳/۳ ± ۹۶/۸ میلی گرم در دسی‌لیتر) شد (P < ۰/۰۰۱). از سوی دیگر، مصرف پروبیوتیک میزان قند خون را در موش های مبتلا به دیابت را کاهش داد (P = ۰/۰۰۶)، اما اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با گروه سالم- شاهد همچنان معنی‌دار باقی ماند (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۴).

سنجش انسولین سرم در گروه های مورد آزمون نشان داد که القای دیابت سبب کاهش میزان انسولین تا حدود ۵۰ درصد در موش های مبتلا به دیابت نسبت به موش های سالم (۰/۱۴ ± ۳/۲۶ در برابر ۰/۲۲ ± ۷/۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) شد (P < ۰/۰۰۱). تجویز مکمل پروبیوتیک، سطح انسولین سرم را در موش‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با موش‌هایی که پروبیوتیک مصرف نکردند افزایش داد (P < ۰/۰۰۱)، اما نه به اندازه‌ای که میزان انسولین به حد طبیعی بازگردد. در نتیجه اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با گروه سالم- شاهد همچنان معنی‌دار باقی ماند (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۵).

بحث

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه القای دیابت باعث جلوگیری از القای LTP در موش ها شد، در حالی که تجویز مکمل پروبیوتیک از سرکوب LTP در موش‌های مبتلا به دیابت ممانعت کرد؛ به طوری که اختلاف معنی‌داری در القای LTP بین موش‌های دیابتیک گروه شاهد و موش‌های دیابتیک دریافت‌کننده‌ی پروبیوتیک مشاهده شد. با این همه جلوگیری از سرکوب و بهبود القا به حدی نبود که القای LTP در گروه دیابت- پروبیوتیک به حد گروه سالم- شاهد برسد. همچنین، نتایج بیانگر این بود که



شکل ۵. میزان انسولین سرم موش‌ها (نانوگرم در میلی‌لیتر) در روز آخر آزمایش در گروه‌های مختلف.

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نمایش داده شده است.

***: اختلاف بین DC (دیابت- شاهد) و CO (سالم- شاهد) (P < ۰/۰۰۱) #: اختلاف بین DC و DP (دیابت- پروبیوتیک) (P < ۰/۰۰۱)**

$: اختلاف بین DP و CO (P < ۰/۰۰۱)

مصرف پروبیوتیک در موش‌های مبتلا به دیابت از کاهش وزن ناشی از دیابت به خوبی جلوگیری می کند؛ به طوری که اختلاف معنی داری بین گروه دیابت- پروبیوتیک و سالم- شاهد وجود نداشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که پروبیوتیک از افزایش گلوکز و کاهش انسولین خون ناشی از دیابت جلوگیری کرد، اما نه به طور کامل؛ به گونه ای که اختلاف بین گروه‌های دیابت- پروبیوتیک و دیابت- شاهد معنی دار شد، اما در عین حال اختلاف بین گروه های دیابت- پروبیوتیک و سالم- شاهد معنی‌دار باقی ماند.

تحقیقات نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت، از طریق مکانیسم های تخریبی همچون اتواکسیداسیون گلوکز (۵)، گلیکوزیلاسیون آنزیم های آنتی اکسیدان مثل گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (۷)، اختلال در عملکرد میتوکندری ها و متعاقب آن نقص در متابولیسم مغز، سبب تخریب DNA و آسیب به سلول‌های بدن ازجمله نورون‌ها می شود و در نتیجه باعث بروز اختلال در عملکرد سیستم عصبی محیطی و مرکزی می شود (۲۹-۲۸). LTP به طور گسترده‌ای به عنوان مکانیسم ذخیره‌سازی اطلاعات در مغز پذیرفته شده است (۳۰). نتایج مطالعات مختلف، نشان‌دهنده ی وجود اختلال در روند یادگیری، تثبیت حافظه و اعمال شناختی همراه با اختلال در القای LTP در نتیجه ی ابتلا به دیابت است (۳۲-۳۱). ما نیز در این مطالعه به نتیجه ی مشابهی دست یافتیم. بر اساس یافته‌های ما، موش های مبتلا به دیابت پس از گذشت ۸ هفته ابتلای به دیابت دچار نقص واضح در القای LTP شدند.

طبق بررسی انجام‌شده، تاکنون مطالعه‌ای درباره‌ی اثر پروبیوتیک بر القای LTP در موش های مبتلا به دیابت صورت نگرفته است، اما برخی مطالعات انسانی بیان‌کننده ی این مطلب است که فلور میکروبی روده بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی تأثیر دارد و

مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها و تعادل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اثرات مفیدی بر خلق و خو و اختلالات روانی همچون افسردگی و اضطراب دارد (۳۴-۳۳). تحقیقات انجام شده نشان می دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از تخریب نورون‌ها و بهبود اختلالات شناختی در دیابت مؤثر هستند و تجویز ویتامین E و ملاتونین از اختلال یادگیری و حافظه‌ی ناشی از دیابت جلوگیری می‌کند (۳۵). همچنین نتایج مطالعات صورت‌گرفته بیانگر این مطلب است که برخی سوش‌های پروبیوتیک از جمله انواعی از لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند (۳۷-۳۶) و تجویز آن‌ها از طریق مکانیسم های مختلف مانند افزایش بیوسنتز گلوتاتیون (۳۸)، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما، کبد و روده (۳۷) و افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند SOD (۱۹)، باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند.

اثر پروبیوتیک‌ها در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها مانند آلرژی‌ها (۳۹)، بیماری‌های التهابی (۴۰) و اختلالات متابولیک (۴۱) بررسی شده است. مطالعه ی تأثیر پروبیوتیک‌ها بر دیابت نشان می‌دهد که تجویز خوراکی پروبیوتیک‌ها پیشرفت دیابت ایجادشده توسط استرپتوزوتوسین در موش‌ها را به تأخیر می‌اندازد (۲۵). بنابراین عدم تحمل گلوکز، هیپرگلیسمی و دیس‌لیپیدمی دیرتر در این موش ها بروز می کند و استرس اکسیداتیو در آن‌ها کاهش می‌یابد. پروبیوتیک‌ها سرعت کاهش انسولین، افزایش سطح گلوکز خون و نیز میزان هموگلوبین گلیکوزیله را پایین می‌آورند. به علاوه، پروبیوتیک ها به طور معنی‌داری آسیب اکسیداتیو ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین را در بافت پانکراس از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل نیتریک اکساید، کاهش می‌دهند، و نیز مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل گلوتاتیون، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند (۴۲، ۲۵). علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها، تأثیر این مکمل‌ها در جلوگیری از کاهش انسولین و کمک به حفظ تعادل نسبی آن در بهبود القای LTP مؤثر است؛ چرا که انسولین با اثر بر سیناپس‌های نورونی باعث افزایش فعالیت آن‌ها می‌شود و از این طریق بر فرایندهای ارتباطی بین سلول‌های عصبی تأثیر می‌گذارد (۴۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که انسولین با اثر بر گیرنده‌های NMDA پس سیناپسی باعث تسهیل القای LTP در هیپوکامپ می شود (۴۴). این اثر تسهیل‌کننده ی انسولین، ممکن است از طریق فسفریلاسیون زیر واحدهای گیرنده‌های NMDA (NR2B و NR2A) باشد (۴۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب عنوان شده، مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کند که مصرف پروبیوتیک‌های دارای اثر آنتی اکسیدانی ممکن است باعث بهبود القای LTP، از طریق افزایش ترشح انسولین، کاهش قند خون و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بیماری دیابت شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مشترک مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد ۳۹۰۴۹۱ و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد ۹۰۲۰ می باشد. نویسندگان

مقالـه از اعضـا و کارکنـان محتـرم مرکـز تحقیقـات فیزیولوژی دانشگاه علـوم پزشـکی کاشـان، بـه دلیـل همکاری‌های بسیار آن‌هـا، همچنـین از سـرکار خـانم منصوره سلطانی برای همکـاری بـی‌دریـغ ایشـان در انجام این طرح تحقیقاتی، کمال تشـکر و قـدردانی را به عمل می‌آورند.

References

1. Maret W. Zinc and diabetes. Biometals 2005; 18(4): 293-4.
2. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem 2004; 279(41): 42351-4.
3. Vicentini J, Valentini J, Grotto D, Paniz C, Roehrs M, Brucker N, et al. Association among microalbuminuria and oxidative stress biomarkers in patients with type 2 diabetes. J Investig Med 2011; 59(4): 649-54.
4. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, et al. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. Metabolism 1994; 43(11): 1426-9.
5. Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Ratcliff H, McClenaghan NH, Barnett CR, Flatt PR. Glycation of insulin in the islets of Langerhans of normal and diabetic animals. Diabetes 1996; 45(11): 1489-96.
6. Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. Diabetes 1990; 39(11): 1420-4.
7. Duzguner V, Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. Free Radic Biol Med 2007; 42(10): 1481-6.
8. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA, Jr., Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, et al. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. J Biol Chem 1988; 263(4): 1665-75.
9. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997; 82(2): 291-5.
10. Aly HF, Mantawy MM. Comparative effects of zinc, selenium and vitamin E or their combination on carbohydrate metabolizing enzymes and oxidative stress in streptozotocin induced-diabetic rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012; 16(1): 66-78.
11. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci 2000; 23(11): 542-9.
12. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res 2010; 107(9): 1058-70.
13. Otto-Buczkowska E, Machnica L. Metabolic memory - the implications for diabetic complications. Endokrynol Pol 2010; 61(6): 700-3.
14. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. Lancet Neurol 2006; 5(1): 64-74.
15. Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. Diabetologia 2005; 48(12): 2460-9.
16. Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. Neuroscience 2005; 130(4): 843-52.
17. Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. Diabetes Res Clin Pract 1999; 45(2-3): 137-46.
18. Karasu C, Dewhurst M, Stevens EJ, Tomlinson DR. Effects of anti-oxidant treatment on sciatic nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats; comparison with essential fatty acids. Diabetologia 1995; 38(2): 129-34.
19. D'Souza A, Fordjour L, Ahmad A, Cai C, Kumar D, Valencia G, et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. Pediatr Res 2010; 67(5): 526-31.
20. Songisepp E, Kals J, Kullisaar T, Mandar R, Hutt P, Zilmer M, et al. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. Nutr J 2005; 4: 22.
21. Food and Agriculture Organization, World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [Online]. 2001. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_

management/probiotics/en/.
22. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 399S-405S.
23. Karimi O, Pena AS. Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics. Drugs Today (Barc) 2003; 39(8): 565-97.
24. Pena JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. Cell Microbiol 2003; 5(4): 277-85.
25. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Oral administration of dahi containing probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. J Dairy Res 2008; 75(2): 189-95.
26. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. Lab Anim 2011; 45(3): 131-40.
27. Talaei SA, Sheibani V, Salami M. Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. Hippocampus 2010; 20(3): 447-55.
28. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. J Diabetes Sci Technol 2008; 2(6): 1101-13.
29. Moreira PI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. J Neurol Sci 2007; 257(1-2): 206-14.
30. Salami M, Talaei SA, Davari S, Taghizadeh M. Hippocampal long term potentiation in rats under different regimens of vitamin D: an in vivo study. Neurosci Lett 2012; 509(1): 56-9.
31. Grzeda E, Wisniewska RJ. Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2008; 68(3): 398-406.
32. Jiang LY, Tang SS, Wang XY, Liu LP, Long Y, Hu M, et al. PPARgamma agonist pioglitazone reverses memory impairment and biochemical changes in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. CNS Neurosci Ther 2012; 18(8): 659-66.
33. Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. Eur J Clin Nutr 2007; 61(3): 355-61.
34. Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. Gut Microbes 2011; 2(4): 256-61.
35. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. Eur J Pharmacol 2006; 537(1-3): 106-10.
36. Mikelsaar M, Zilmer M. Lactobacillus fermentum ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. Microb Ecol Health Dis 2009; 21(1): 1-27.
37. Uskova MA, Kravchenko LV. Antioxidant properties of lactic acid bacteria--probiotic and yogurt strains. Vopr Pitan 2009; 78(2): 18-23. [In Russian].
38. Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzen LE, et al. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008; 295(5): G1111-G1121.
39. Isolauri E, Salminen S. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. J Clin Gastroenterol 2008; 42(Suppl 2): S91-S96.
40. Bohm SK, Kruis W. Probiotics: do they help to control intestinal inflammation? Ann N Y Acad Sci 2006; 1072: 339-50.
41. Burcelin R, Luche E, Serino M, Amar J. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? Front Biosci 2009; 14: 5107-17.
42. Yadav H, Jain S, Sinha PR. The effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei on gastropathic consequences in diabetic rats. J Med Food 2008; 11(1): 62-8.
43. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(9): 3100-5.
44. McNay EC, Fries TM, Gold PE. Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(6): 2881-5.
45. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur J Pharmacol 2004; 490(1-3): 13-24.

Journal of Isfahan Medical School Received: 26.10.2012

Vol. 30, No. 218, 4th Week, February 2013 Accepted: 04.01.2013

Effects of Supplementation with Probiotics on Long-Term Potentiation Impairment in Diabetic Rats

Saeideh Davari[1], Sayyed Alireza Talaei[2], Mahmoud Salami PhD[3], Mohammad Reza Fazeli PhD[4], Hojatollah Alaei PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Increased oxidative stress load in diabetes mellitus can damage learning and memory. Since probiotics have been suggested to reduce this load, this study investigated the effects of probiotics on induction of long-term potentiation (LTP) in neurons of hippocampal cornu ammonis 1 (CA1) area of diabetic rats.

Methods: This experimental study was carried out on 40 male Wistar rats in four randomly allocated groups of 10. The groups were named as control (CO), control-probiotic (CP), control-diabetic (CD), and diabetic-probiotic (DP). Probiotic supplements included *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium lactis* (334 mg of each with colony-forming units ~ 10^{10}). The supplement was solved in drinking water each 12 hours and used for eight weeks. Stimulating hippocampal Schaffer collaterals, field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) of neurons of CA1 area were recorded for 30 minutes. Then, high frequency stimulation was performed and fEPSPs were recorded for 120 minutes.

Findings: Comparing to the control animals, induction of diabetes caused decreases in the basic responses of neurons ($P < 0.001$). On the other hand, supplementation with probiotics could restore the responses. Moreover, diabetes prevented LTP induction in CA1 area neurons and probiotics opposed it. DP animals showed conspicuous increases in weight ($P = 0.031$) and serum insulin ($P < 0.001$) and a reduction in blood sugar ($P = 0.006$).

Conclusion: Probiotics supplement improves impairment of LTP induction in diabetic rats' hippocampus via increase in insulin secretion, decrease in blood sugar, and may be rise of antioxidant capacity.

Keywords: Diabetes mellitus type 1, Long-term potentiation, Hippocampus, Probiotic supplement, Rat

Citation: Davari S, Talaei SA, Salami M, Fazeli M, Alaei H. **Effects of Supplementation with Probiotics on Long-Term Potentiation Impairment in Diabetic Rats.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(218): 2236-47

* This paper is derived from a MSc thesis No. 390491 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Physiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Student, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3- Professor, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
4- Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hojatollah Alaei PhD, Email: alaei@med.mui.ac.ir